Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 2, Summer 2022, p. 183-195

Evaluation of Antifungal Effect of Biodegradable Nano Encapsulated Extract of *Trichoderma harzianum*

M. Shahiri Tabarestani [1]*

Received: 06-03-2022
Revised: 09-04-2022
Accepted: 10-05-2022
Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:
Shahiri Tabarestani, M. (2022). Evaluation of Antifungal Effect of Biodegradable Nano Encapsulated Extract of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Iranian Plant Protection Research 36*(2): 183-195. (In Persian with English abstract)
DOI: 10.22067/jpp.2022.75620.1081

Introduction

Chemical fungicides are widely used as effective control agents on a great diversity of fungal plant diseases. However, their excessive use, causes environmental pollution and health problems. Biological control as an environmentally friendly method can be a good alternative for chemical fungicides. *Trichoderma* is one of the antagonistic fungi with rapid adaptation to a wide variety of habitats. *Trichoderma harzianum* is a powerful agent for biocontrol of plant pathogens. It also can be used as a plant growth stimulant. However, its efficacy can be affected by biotic and abiotic factors, and encapsulation has been used to maximize its efficacy. Encapsulation process provides a protective barrier around the biocontrol agent, so the harmful external factors such as pH, humidity, and ultraviolet radiation do not damage its action. Encapsulation of the bioactive agents has been developed in recent years as a new potential tool for ecological and sustainable plant production. Encapsulation in biopolymer matrices has been recognized as an effective method for controlled release of a bioactive agent used for plant protection. Chitosan, the deacetylated derivative of chitin polysaccharide is one of the most important biopolymers that is widely used in biological and medical sciences especially for encapsulating essential oils and extracts due to its biocompatibility, low toxicity and biodegradability into safe byproducts. In this study, antifungal effects of nano capsulated *Trichoderma* extract (NCTE) and *Trichoderma* extract (TE) against *Macrophomina phaseolina* have been investigated.

Materials and Methods

The nanocapsules were prepared by ionic gelation method. This is one of the most advantageous techniques for the production of nanocapsules. This technique is easy to perform and avoids the use of organic solvents. The biocompatible and biodegradable polymer, chitosan, was used as a capsule coating agent. After extraction of *T. harzianum* secondary metabolites, encapsulation process was carried out. Tripolyphosphate was used as cross-linking agent in the encapsulation process. The surface morphology of the nanoparticles was considered using Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM). The mean particle sizes of the prepared nanoparticles were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) technique. For consideration of the antifungal effects of nano encapsulated *Trichoderma* extract (NCTE) and *Trichoderma* extract (TE) against *Macrophomina phaseolina*, strile potato dextrose agar (PDA) containing different concentrations of NCTE and TE were prepared. After 5 days, colony diameter of the pathogen was measured in all treatments. The inhibitory effect was calculated compared with the control. Data were statistically analyzed by SAS software.

Results and Discussion

The obtained results indicated that the prepared nanoparticles were spherical in shape and the average size was equal to 77.91 nm with poly dispersity index (PDI) 0.23554. PDI value indicated the physical stability of the nanoparticles and prevented aggregation of the particles. Antifungal effects of NCTE and TE were observed in all treatments, however nanocapsules contains *Trichoderma* extract were more effective than *Trichoderma* extract. In each treatment containing TE and NCTE, maximum inhibitory effect was related to concenteration of

1- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email:maedeshahiri@pnu.ac.ir)

30 percent. In consideration of ihibition percent of NCTE and TE on *M. phaseolina* within 5 days, it was found that on the first and second days, inhibitory effect of TE was more than NCTE. However, on the third, fourth and fifth days, there were no statistically significant difference between treatments in TE while in NCTE, a significant increasing was observed. The reason for the high inhibition percent in TE treatment in the first and second days was related to rapid release of active ingredients in the culture medium and the passage of time had no effect on improving its yield. According to the results in this research, it can be concluded that chitosan nanoparticles will be a good carrier for *Trichoderma* extract encapsulation. It also improves their antifungal activity against *M. phaseolina*.

Conclusion

Nano-encapsulation of the bioactive compounds enhances physical stability, protects them from oxidation process, controlling their release, improves water dispersion of hydrophobic compounds and enhances their bioactivity efficacy. In this study, nano encapsulation of *Trichoderma* extract, increased its antifungal effects over time. Nano encapsulated particles containing antagonistic fungi were able to control the pathogenic fungus more effectively and in a longer period of time due to the controlled release of the fungal extract. Results showed that antifungal efficiency of *T. harzianum* was increased by nano encapsulation procedure. Since chitosan is a biodegradable polymer without any harms for safety, this technique can be suggested as a good candidate for biological control. Our future investigations are directed to test nanocapsules simultaneously loaded with biological agents on *M. phaseolina* under greenhouse and field conditions.

Keywords: Antifungal effects, Chitosan, *Macrophomina phaseolina*, Nanocapsulation, *Trichoderma harzianum*

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۱۹۵-۱۸۳

ارزیابی اثر ضدقارچی عصاره نانوکپسوله زیست‌سازگار *Trichoderma harzianum*

مائده شهیری طبرستانی[1*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۰

چکیده

قارچ *Trichoderma harzianum* به‌عنوان یک عامل شناخته شده کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی و همچنین افزایش دهنده رشد گیاهان، در کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اثرات تخریب‌کننده عوامل زنده و غیرزنده بر کارایی این قارچ، کپسوله کردن عوامل زیستی با پلیمرهای زیست‌تخریب پذیر می‌تواند سد محافظتی اطراف این قارچ ایجاد نماید. در سال‌های اخیر، این فناوری زیست‌سازگار، مورد توجه محققین قرار گرفته است. در این پژوهش اثرات ضدقارچی عصاره خام و نانوکپسول‌های کیتوسان حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* در برابر قارچ بیمارگر *Macrophomina phaseolina* (عامل بیماری پوسیدگی ذغالی سویا) مورد بررسی قرار گرفت. تهیه نانوکپسول‌ها به روش ژلاسیون یونی انجام شد. مطالعات ریخت‌شناسی نانوذرات کپسوله شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی انجام گرفت. میانگین اندازه نانوذرات و همچنین پایداری آنها با روش طیف‌سنجی پراکندگی نور هیدرودینامیکی اندازه‌گیری شد. جهت بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره خام و نانوکپسول‌های کیتوسان حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست، محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) سترون حاوی غلظت‌های مختلف هر یک از تیمارها تهیه گردید. قطر پرگنه قارچ بیمارگر پس از ۵ روز، اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری نسبت به شاهد محاسبه شد. نتایج حاصل از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد، نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست به‌صورت ذرات کروی یکنواخت با میانگین قطر ۷۷/۹۱ نانومتر می‌باشند. اثرات ضدقارچی نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد، نانوکپسوله کردن عصاره قارچ آنتاگونیست، سبب افزایش معنی‌داری در قدرت بازدارندگی قارچ عامل بیماری گردید. عصاره نانوکپسوله شده با گذشت زمان به دلیل رهایش کنترل شده عصاره، به‌طور موثرتر و در مدت زمان بیشتری می‌تواند قارچ بیمارگر را کنترل نماید. بنابراین، به‌نظر می‌رسد کپسوله کردن عصاره *T. harzianum*، در حفظ اثرات ضدقارچی آنتاگونیست در برهمکنش با محیط اطراف نقش دارد.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضدقارچی، کیتوسان، نانوکپسول، *Macrophomina phaseolina*، *Trichoderma harzianum*

مقدمه

سال‌های متمادی جهت کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی از سموم شیمیایی استفاده شده است. این ترکیبات آلودگی زیست محیطی، کاهش تنوع زیستی و مقاومت بیمارگرها را موجب گردید. بدین جهت، استفاده از ترکیبات طبیعی زیست‌سازگار[2] جهت کنترل زیستی[3] بیمارگرهای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. در بین عوامل کنترل زیستی، قارچ تریکودرما، از قدرت ساپروفیتی بالایی برخوردار است. گونه‌های مختلف این قارچ به‌خصوص گونه‌ی *Trichoderma harzianum* به‌دلیل توانایی تولید مقادیر بالای آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه، جهت کنترل بیمارگرهای گیاهی استفاده می‌شوند (Heydari and Evidente *et al.*, 2003; Pessarakli, 2010; Hung, 2015; Jelen *et al.*, 2013; Kucuk and Kivanc, 2005; Vinale *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2014). گونه‌های تریکودرما از طریق مایکوپارازیتیسم، تولید ترکیبات ضدمیکروبی، آنزیم‌های خاص (کیتیناز، بتا گلوکاناز، سلولاز و پروتئاز)،

۱- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: maedeshahiri@pnu.ac.ir
DOI: 10.22067/JPP.2022.75620.1081

2- Biocompatible
3- Biological control

آنتی‌بیوز، رقابت و تحریک مقاومت در گیاه میزبان، قارچ بیمارگر را کنترل می‌نمایند. آنزیم‌های تولید شده توسط این قارچ می‌توانند با تجزیه دیواره سلولی به درون هیف قارچ‌های بیمارگر گیاهی، نفوذ و آنها را کلونیزه نمایند (Howell, 2003; Harman, 2006). باتوجه به اثرگذاری شرایط محیطی (ازجمله اشعه ماوراء بنفش نور خورشید، دما و رطوبت نسبی محیط) بر خاصیت آنتاگونیستی این قارچ، توسعه فرمولاسیون‌های تجاری که بتواند فعالیت ضدقارچی تریکودرما را در طی زمان حفظ نماید، ضروری است. یکی از این روش‌ها، استفاده از فناوری کپسوله کردن ترکیبات زیستی است که در سال‌های اخیر به عنوان یک روش قدرتمند در صنعت کشاورزی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. کپسوله کردن، یک سد دفاعی اطراف عامل زیست فعال ایجاد می‌نماید به‌طوری‌که آن را در برابر عوامل زیان‌بار محیطی محافظت می‌نماید. با فرایند کپسوله‌سازی در پلیمر زیستی[1]، آزادسازی ماده زیست فعال به‌صورت کنترل‌شده صورت پذیرفته و به‌تدریج مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرد (Abdelkader *et al.*, Wu *et al.*, 2017; 2018).

کیتوسان یک پلیمر زیستی با خاصیت ضدمیکروبی است که از پلی‌ساکارید دیگری به نام کیتین مشتق می‌شود (Kumar *et al.*, 2020). کیتین در طبیعت پس از سلولز، فراوان‌ترین پلیمر است. با استیل‌دار شدن ساختار شیمیایی کیتین، پلیمری با ساختار پیچیده‌تر و کاربردهای گسترده‌تر حاصل می‌شود که کیتوسان نام دارد. عمده‌ترین منبع تأمین کیتوسان، بافت بیرونی و ضخیم بدن بی‌مهرگان آبزی است که نژادهایی از میگو و خرچنگ بیشترین سهم را در تولید کیتوسان دارند. برخی از سبزیجات، مخمرها و قارچ‌های خاکزی نیز منابع دیگر کیتوسان در طبیعت هستند. این پلی‌ساکارید طبیعی، در آب نامحلول است اما در محیط اسیدی قابلیت انحلال آن افزایش می‌یابد. بنابراین با افزایش مقدار کمی استیک اسید و یا سیتریک اسید می‌توان قابلیت انحلال کیتوسان را تنظیم نمود (Naskar *et al.*, 2019; Sarvaiya and Agrawal, 2015). کیتوسان با ساختار پلی‌کاتیونی، زمانی که در کنار ماده شیمیایی دیگر با بار منفی قرار می‌گیرد، می‌تواند با ایجاد یک زنجیره کاتیونی- آنیونی، موجب سنتز نانو ذرات شود. در این فرایند، ماده موثره موجود در عصاره بدون تشکیل پیوند شیمیایی در ساختار نانوذرات قرار می‌گیرد و می‌تواند با سرعت رهایش کنترل شده، آزاد شود (Abdelkader *et al.*, 2018; Akbari *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2014). در بین روش‌های سنتز نانوذره با کیتوسان، روش ژلاسیون یونی به‌روزترین و از لحاظ بازدهی و کیفیت، روش مناسبی برای دست‌یابی به نانوذرات می‌باشد. در این روش، تشکیل پیوند شیمیایی، عامل اتصال عرضی بین گروه‌های عاملی کیتوسان و تری‌پلی‌فسفات[2] نمی‌باشد بلکه نیروهای الکترواستاتیکی که میان یون‌های مثبت (کیتوسان) و منفی (تری‌پلی‌فسفات) ایجاد می‌شود، سبب اتصال عرضی خواهد شد (Sreekumar *et al.*, 2018; Agnihotri *et al.*, 2004). شکل ۱، خلاصه‌ای از مراحل تشکیل نانوذرات کپسوله شده عصاره قارچ آنتاگونیست به روش ژلاسیون یونی را نشان می‌دهد.

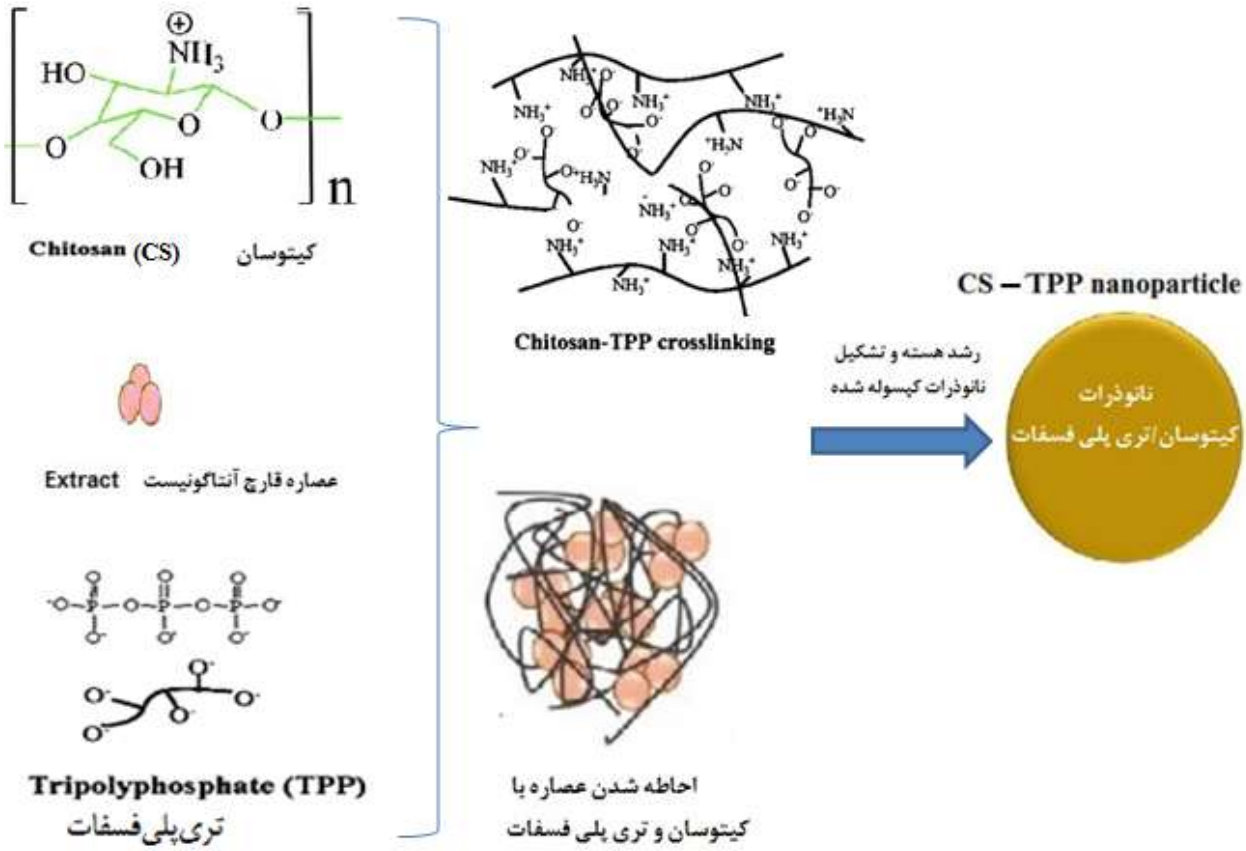
وینسکوویچ و همکارانش (Vincekovic *et al.*, 2016) میکروکپسول‌هایی با سیستم کیتوسان - آلژینات سنتز نمودند که به‌صورت هم‌زمان توسط یون‌های مس و گونه *T. viride* بارگذاری شد. طبق این مطالعه، ذرات مس و متابولیت‌های گونه‌ی تریکودرما تأثیر منفی بر روی فعالیت یکدیگر نداشتند و متابولیت‌های *T. viride* به علت داشتن اسپور، سرعت رهایش کمتر و قابل قبول‌تری داشتند. مانسرا- لوپز و همکارانش (Mancera-López *et al.*, 2019)، تأثیر فرآیند کپسوله کردن در افزایش نرخ رشد و کیفیت قدرت کنترل زیستی گونه *T. harzianum* را بر چند قارچ بیمارگر گیاهی به اثبات رساندند.

اثرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نانوکپسوله‌های کیتوسان حاوی منبع قارچی و نانوذرات نقره توسط ساتیاسیلان و همکارانش (Sathiyaseelan *et al.*, 2020) مشاهده شد.

در این پژوهش اثر ضدقارچی قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* در برابر قارچ بیمارگر خاکزی *M. phaseolina* (عامل بیماری پوسیدگی ذغالی سویا) در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه تاکنون اثرات ضدقارچی گونه‌های تریکودرما بر بسیاری از قارچ‌های بیمارگر به اثبات رسیده است، اما در این تحقیق سعی شد تا با استفاده از فناوری نانو و تهیه نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست، افزایش اثرات ضدقارچی آنتاگونیست مورد مطالعه انجام گیرد. در این فناوری، با کاهش اندازه ذرات در حد نانومتر، فعالیت ذره‌ای و سطح فعال افزایش می‌یابد. بنابراین به‌نظر می‌رسد اگر متابولیت‌های ثانویه قارچ آنتاگونیست به‌صورت نانوذرات با بیمارگرها مواجه شوند، اثر کنترل زیستی بیشتری خواهند داشت. با توجه به حساسیت متابولیت‌های ثانویه به عوامل محیطی و به‌منظور کاهش سرعت رهایش ماده مؤثره در محیط میزبان و در نتیجه افزایش کارایی فرآیند کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی، تولید نانوکپسول‌های قارچ آنتاگونیست، هدف اصلی این پژوهش می‌باشد.

1- Biopolymer

2- Tripolyphosphate (TPP)



شکل ۱- شماتیک مراحل تشکیل نانو ذرات کپسوله شده عصاره قارچ *T. harzianum*

Figure 1- Schematic processes formation of encapsulated nanoparticles of *T. harzianum* fungal extract

مواد و روش‌ها

مواد

کیتوسان با وزن مولکولی پایین، استیک اسید، سدیم هیدروکسید و سدیم تری پلی فسفات (STPP) از تولیدات شرکت سیگما آلدریچ (Sigma-Aldrich) تهیه گردید.

تهیه گونه‌های قارچی

قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* (NCBI GeneBank accession No. JX173852.1) از مجموعه قارچ‌های آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده تولیدات گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان دریافت گردید. این جدایه از خاک مزارع کلزا گرگان (استان گلستان) جداسازی و توسط رهنما و همکاران شناسایی شده بود (Shahiri *et al.*, 2016a). کشت تک اسپور این جدایه بر روی محیط کشت PDA تهیه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و به‌عنوان منبع ماده بیولوژیک استفاده شد.

قارچ بیمارگر (NCBI GeneBank accession No. KY549686) *Macrophomina phaseolina* که از ساقه‌های سویای آلوده به بیماری پوسیدگی ذغالی جداسازی شده بود از مرکز تحقیقات کشاورزی استان مازندران- بخش آفات و بیماری‌های گیاهی، تهیه گردید. به‌منظور کشت دوباره، یک حلقه از حاشیه پرگنه قارچ برداشته و روی محیط کشت PDA کشت داده شد و پس از آزمون بیماریزایی روی سویا، مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی عصاره قارچ آنتاگونیست

جهت تهیه عصاره قارچ آنتاگونیست، از حاشیه پرگنه ۵ روزه قارچ *T. harzianum* روی محیط کشت PDA[1]، دو دیسک ۷ میلی‌متری برداشته شد و در شرایط سترون به ارلن مایر یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB[2] یک‌پنجم قدرت سترون، افزوده شد. محیط کشت در شرایط سکون و دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس و

1- Potato dextrose agar
2- Potato dextrose broth

شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۳۰ روز نگهداری شد. پس از طی این مدت، جهت همگن‌سازی محلول حاوی عصاره قارچی، از سیستم یکنواخت‌ساز[1] (سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) استفاده گردید. محلول حاصل تحت شرایط خلأ از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ و فیلتر سرسرنگی با اندازه ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد تا به‌طورکامل، عاری از اسپور شود. محلول عصاره حاصل در دستگاه تبخیرکننده چرخشی[2] تحت خلأ تغلیظ گردید. جهت آماده‌سازی عصاره خشک قارچ آنتاگونیست، از دستگاه خشک‌کن انجمادی تحت خلأ[3] (مدل FDE-350 Korea) و دمای ۵۰- درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. عصاره خشک شده، جهت استفاده در مراحل بعدی در یخچال و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید (Vinale *et al.*, 2006).

آماده سازی نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

در این مرحله نانوکپسول‌های کیتوسان- تری‌پلی‌فسفات، به‌روش ژلاسیون یونی سنتز شده و عصاره قارچ آنتاگونیست در فضای خالی بین شبکه ایجاد شده، محبوس شد (Fan *et al.*, 2012). شکل ۲ فرایند آزمایشگاهی سنتز نانوکپسول را نشان می‌دهد. پس از انجام واکنش، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا رسوب ژلاتینی نانوکپسول، ته‌نشین شود (شکل ۲).

بررسی ریخت‌شناسی نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی

از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی[4] (FE-SEM) (مدل MIRA3TESCAN-XMU) جهت مطالعات ریخت‌شناسی[5] نانوذرات کپسوله شده، استفاده گردید.

اندازه‌گیری قطر نانوذرات کپسوله شده

میانگین اندازه نانوذرات و همچنین پایداری ذرات در محلول به روش پراکندگی هیدرودینامیکی نور با استفاده از دستگاه DLS[6] (مدل VASCO شرکت Cordouan Tech ساخت کشور فرانسه) اندازه‌گیری شد.

1- Homogenizer
2- Rotary evaporator
3- Vacuum freeze dryer
4- Field Emission Scanning Electron Microscopy
5- Morphology
6- Dynamic Light Scattering

بررسی خصوصیات ضدقارچی عصاره خام و نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

جهت بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره خام (TE)[7] و نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست (NCTE)[8]، محیط کشت PDA سترون حاوی غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد هر یک از تیمارها تهیه گردید. جهت تیمار شاهد از غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد آب مقطر سترون با محیط کشت PDA سترون استفاده شد (Shahiri *et al.*, 2016b). پس از انعقاد محیط کشت، قرص‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر از پرگنه ۵ روزه قارچ بیمارگر *M. phaseolina* جدا گردید و در مرکز هر یک از تشتک‌های فوق، قرار داده شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. قطر پرگنه قارچ ۵ روز پس از نگهداری در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد و درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری نسبت به شاهد، طبق رابطه یک محاسبه گردید. به‌منظور بررسی رهایش کنترل‌شده NCTE و مقایسه آن با TE، قطر پرگنه قارچ بیمارگر در غلظت ۳۰ درصد تیمارهای فوق، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز پس از کشت نیز اندازه‌گیری شد. بررسی اثرات ضدقارچی تیمارها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های بدست آمده از آزمایشات، با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد به نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (Vinale *et al.*, 2006).

$$IG= [(C-T)/C] \times 100 \quad [1]$$

IG = درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر
C = قطر پرگنه قارچ بیمارگر در شاهد
T = قطر پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار

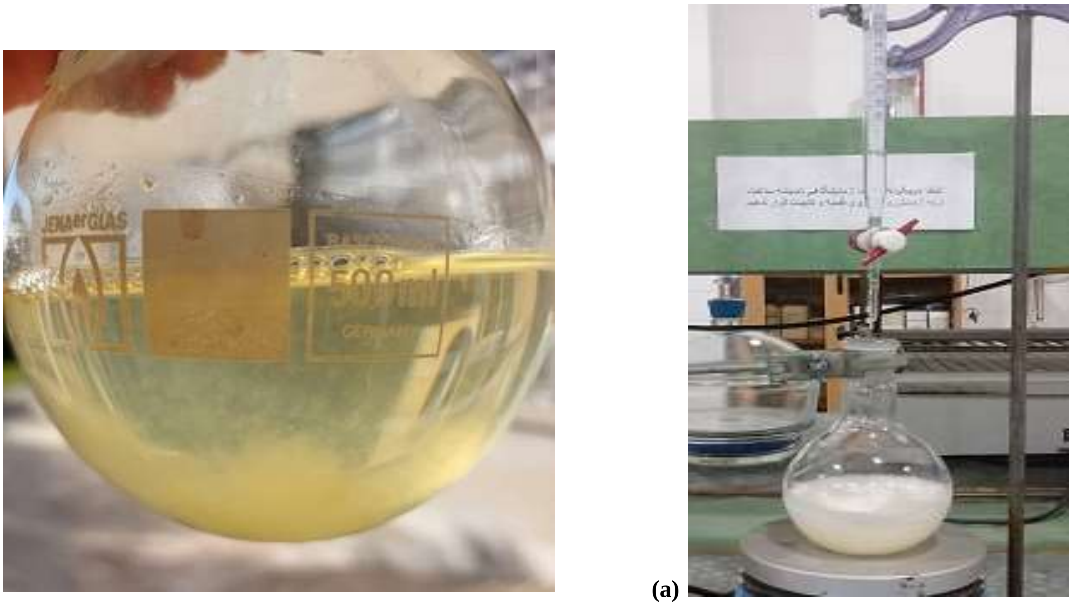
نتایج

ریخت‌شناسی نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی

تصویر سطوح خارجی نانوذرات کپسوله شده حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست در شکل ۳ قابل مشاهده است. در این شکل نانوذرات کپسوله شده به‌صورت ذرات کروی یکنواخت با تقارن نسبی و قطر زیر ۱۰۰ نانومتر به‌وضوح دیده می‌شود. لازم به ذکر است قبل از انجام تصویربرداری (FE-SEM)، فرآیند اولتراسونیک جهت جداسازی نانوذرات و جلوگیری از تجمع آنها انجام پذیرفت.

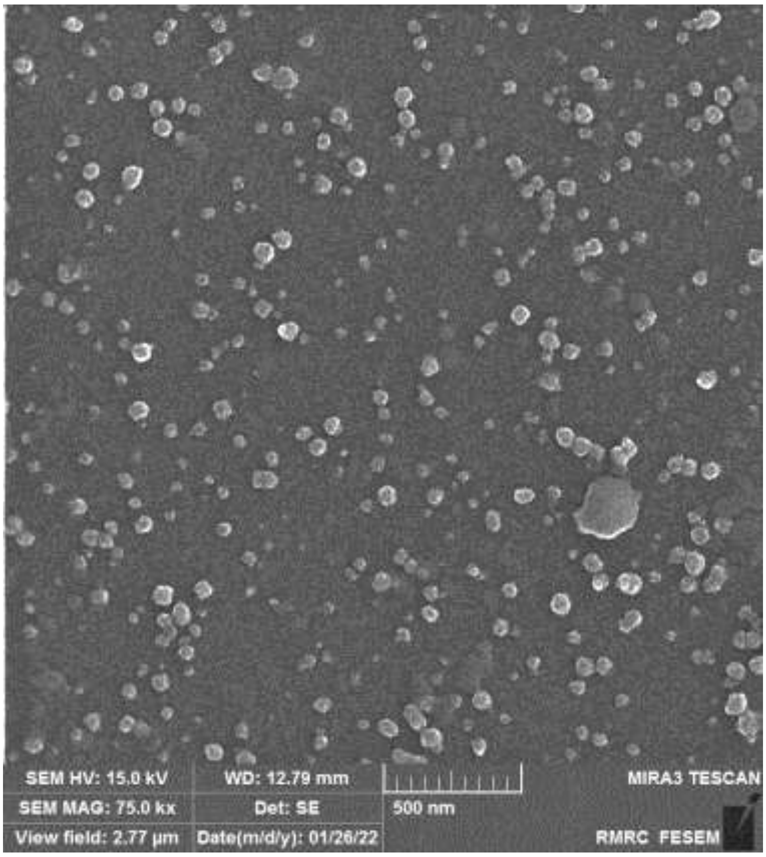
7- *Trichoderma* Extract (TE)
8- Nano Capsulated *Trichoderma* Extract (NCTE)



(b) (a)

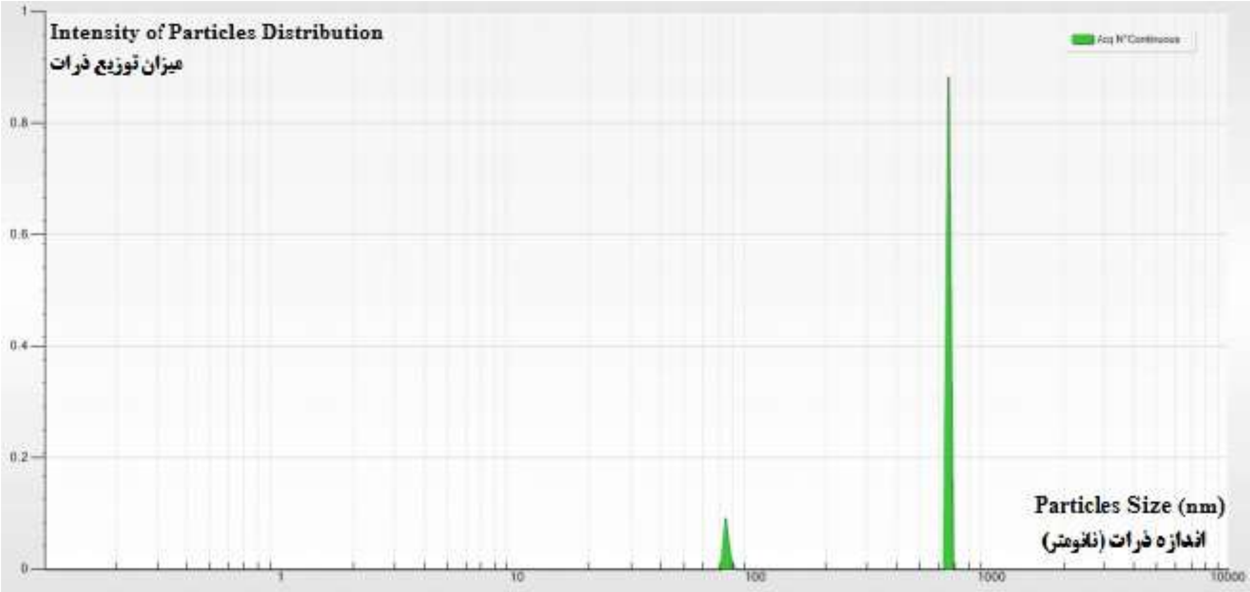
شکل ۲- (a) فرآیند کپسوله‌کردن عصاره *T. harzianum* به روش ژلاسیون یونی (b) رسوب ژله‌ای نانوکپسول عصاره *T. harzianum*

Figure 2- (a) Encapsulation process of *T. harzianum* extract by ionic gelation method
(b) Nanocapsule gel precipitation of *T. harzianum* extract



شکل ۳- تصویر سطوح خارجی نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* به روش میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی

Figure 3- Image of external surfaces of nanocapsules containing *T. harzianum* extract by field emission scanning electron microscopy



شکل ۴- میزان تفکیک و توزیع اندازه نانوذرات براساس اندازه‌گیری به روش پراکندگی نور هیدرودینامیکی

Figure 4- The amount of separation and size distribution of nanoparticles based on measurement by hydrodynamic light scattering method

اندازه‌گیری قطر نانوذرات کپسوله شده

قطر نانوذرات کپسوله شده به‌روش پراکندگی هیدرودینامیکی نور، اندازه‌گیری شد. شکل ۴، میزان توزیع ذرات را بر اساس اندازه (قطر) آنها نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، میانگین قطر نانوذرات کپسوله شده حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست، در پیک اول برابر ۷۷/۹۱ نانومتر بود که این عدد با تصویر به‌دست آمده با میکروسکوپ الکترونی روبشی مطابقت دارد. پیک دوم به شکل توده‌های به هم چسبیده ذرات بود که در اثر وجود بار الکتریکی یون‌های تری پلی فسفات (بار الکتریکی منفی) و کیتوسان (بار الکتریکی مثبت) تشکیل گردید. به‌طوری‌که پس از فرآیند اولتراسونیک، مقداری از نمونه‌ها به‌صورت ذرات تجمع یافته[1] باقی ماند. در این پیک، قطر توده‌های تجمع یافته نانوذرات برابر ۶۲۳/۹۹ نانومتر بود که نشان می‌دهد جداسازی نانوذرات کپسوله شده به‌طور کامل انجام نشده و به زمان بیشتری برای اولتراسونیک نیاز داشت. تعداد پیک‌ها با اندازه ذرات مختلف، به مقدار ضریب تفکیک[2] (PDI) بستگی دارد. ضریب مربوطه، میزان پراکندگی اندازه ذرات را مشخص می‌کند که در این اندازه‌گیری برابر ۰/۲۳۵۵۴ گزارش شد. هر چه مقدار ضریب تفکیک کوچکتر باشد بدین‌معنی است که ذرات بهتر از هم جدا شده و پایداری بیشتری دارند. به عبارت دیگر، تنوع جمعیت نانوذرات با اندازه‌های مختلف، کمتر است (Caputo *et al*., 2019).

خصوصیات ضدقارچی عصاره خام و نانوذرات کپسوله شده حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد عصاره خام (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* (NCTE)، با افزایش غلظت، میزان بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر *M. phaseolina* افزایش یافت (جدول ۱). براساس داده‌های جدول ۱، از نظر اثر بازدارندگی، غلظت ۳۰ درصد TE و غلظت ۱۰ درصد NCTE در یک گروه آماری قرار گرفتند. این نتیجه نشان می‌دهد، نانوکپسوله کردن عصاره قارچ آنتاگونیست، موجب افزایش اثر بازدارندگی آن می‌شود. در هر کدام از تیمارهای TE و NCTE، بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به غلظت۳۰ درصد بود (شکل ۵). نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد نوع عصاره، غلظت‌های مختلف عصاره و اثر متقابل آنها بر درصد بازدارندگی قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* بر رشد میسلیومی قارچ *M. phaseolina* در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲). در بررسی اثر بازدارندگی غلظت ۳۰ درصد هر یک از تیمارهای TE و NCTE، در برابر رشد میسلیومی قارچ *M. phaseolina* طی مدت پنج روز، افزایش میزان بازدارندگی مشاهده گردید (شکل ۶). اثر بازدارندگی تیمارهای TE و NCTE به ترتیب در دو و چهار گروه آماری قرار گرفت (شکل ۶).

1- Agglomerated
2- Poly Dispersity Index (PDI)

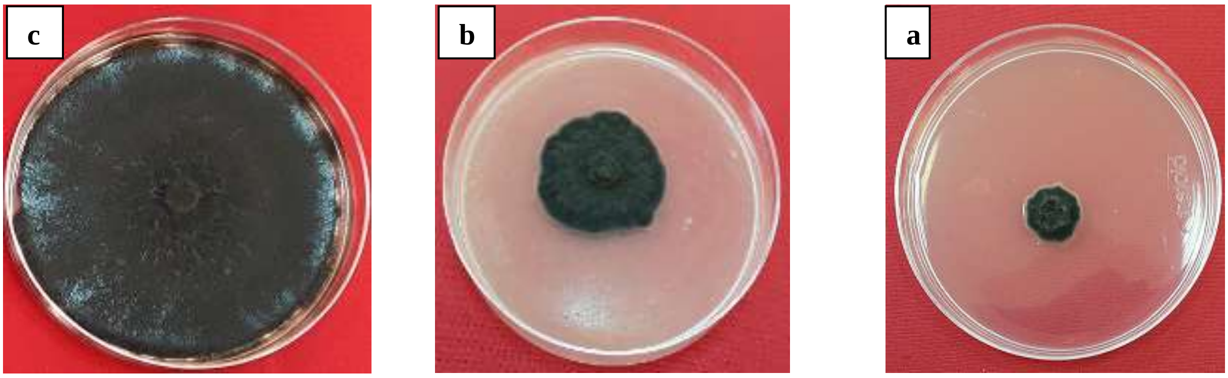
جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره خام *T. harzianum* (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) در برابر رشد قارچ *M. phaseolina* پس از پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Table 1- Effect of different concentrations of *T. harzianum* crude extract (TE) and *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) on *M. phaseolina* after five days in *in-vitro* conditions

غلظت عصاره در هر تشتک (٪) Concentration of extract in each plate (%)	میانگین درصد بازدارندگی (TE) Mean of inhibition percent (TE)	Std	میانگین درصد بازدارندگی (NCTE) Mean of inhibition percent (NCTE)	Std
10	45.66 e	0.04	55.66 c	0.07
20	49 d	0.12	60 b	0.03
30	55.66 c	0.07	70 a	0.09
10 شاهد(control)	0 f	0	0 f	0
20 شاهد(control)	0 f	0	0 f	0
30 شاهد(control)	0 f	0	0 f	0

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<0.01) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.01)



شکل ۵- اثر غلظت ۳۰ درصد (a) عصاره خام *T. harzianum* (TE) و (b) نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر *M. phaseolina* در مقایسه با شاهد (c) بعد از پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Figure 5- Effect of 30 percent concentration of (a) *T. harzianum* crude extract (TE) and (b) *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) on colony diameter of *M. phaseolina* in comparison to control (c) after five days in *in-vitro* condition

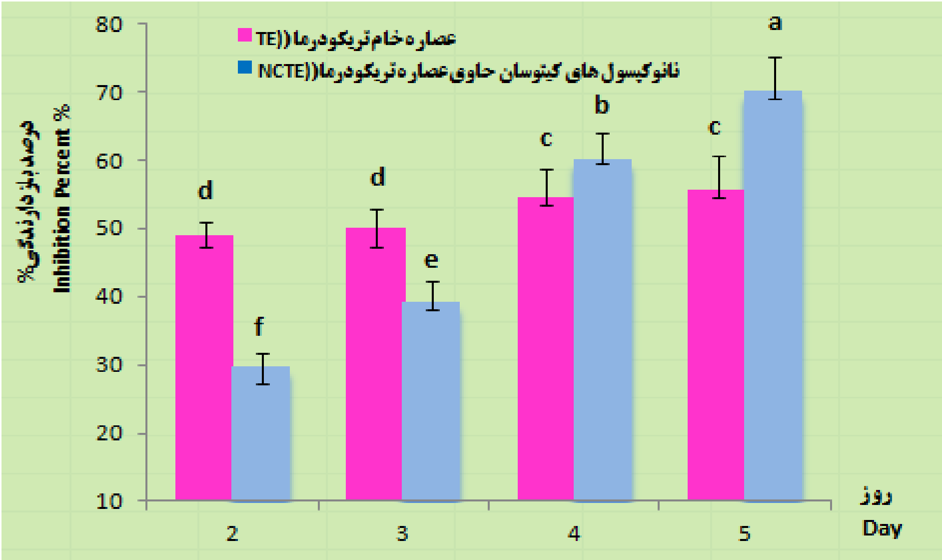
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره خام *T. harzianum* (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) در برابر رشد قارچ *M. phaseolina* پس از پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Table 2- Analysis of variance of inhibitory effect of different concentrations of *T. harzianum* crude extract (TE) and *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) on *M. phaseolina* after five days in *in-vitro* condition

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean square	F
نوع عصاره (T) Kind of extrac	2	139.64	31524.9**
غلظت های عصاره (C) Concentration of extract	2	0.66	150.24**
اثر متقابل (T*C)	4	0.17	39.53**
خطا Error	18	0.0044	-
ضریب تغییرات (٪) (CV)	-	1.27	-

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**:Significant at level of P<0.01



شکل ۶- اثر بازدارندگی غلظت ۳۰ درصد عصاره خام *T. harzianum* (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) در برابر رشد قارچ بیمارگر *M. phaseolina* طی مدت پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Figure 6- Inhibitory effect of 30 percent concentration of *T. harzianum* crude extract (TE) and *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) against growth of *M. phaseolina* within five days in *in-vitro* condition

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی غلظت ۳۰ درصد عصاره خام *T. harzianum* (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) در برابر رشد قارچ بیمارگر *M. phaseolina* طی مدت پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Table 3- Analysis of variance of inhibitory effect of 30 percent concentration of *T. harzianum* crude extract (TE) and *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) on *M. phaseolina* after five days in *in-vitro* condition

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean square	
نوع عصاره (T) Kind of extract	1	33.79	13.35**
روز (D) Day	3	732.70	289.46**
اثر متقابل (T*D)	3	361.78	142.93**
خطا Error	16	2.53	-
ضریب تغییرات (٪) (CV)	-	3.11	-

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**:Significant at level of P<0.01

این اثر در تیمار TE، در روزهای دوم و سوم بیشتر از NCTE بود. درحالی‌که در روزهای چهارم و پنجم، NCTE افزایش چشمگیری در اثر بازدارندگی نسبت به TE نشان داد. این تفاوت در سطح احتمال یک درصد، از نظر آماری معنی‌دار بود. در روزهای چهارم و پنجم، روند افزایشی میزان بازدارندگی در تیمارهای TE ادامه داشت، اما تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد، بین این دو روز مشاهده نشد (شکل ۶). نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد نوع عصاره، روز و اثر متقابل آنها بر اثر بازدارندگی قارچ *T. harzianum* در برابر قارچ *M. phaseolina* در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۳).

اثر بازدارندگی بهتر تیمار NCTE نسبت به TE در روز پنجم، می‌تواند مربوط به رهاسازی کنترل شده متابولیت‌های ثانویه قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* باشد. بالا بودن اثر بازدارندگی در نمونه‌های حاوی TE در روزهای اول، به دلیل رهایش یک‌باره مواد

مؤثره در محیط کشت بود. بدین‌جهت، گذشت زمان تأثیری در بهبود عملکرد این تیمار نداشت.

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش، اثرات ضدقارچی عصاره خام و نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* را بر روی قارچ بیمارگر *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاه اثبات نمود. این اثرات ضدقارچی مربوط به متابولیت‌های ثانویه *T. harzianum* بود. اثرات ضدقارچی متابولیت‌های ثانویه گونه‌های تریکودرما توسط پژوهشگران دیگر نیز گزارش گردید (Morath *et al.*, 2012; Reino *et al.*, 2008; Siddiquee *et al.*, 2012; Siddiquee, 2014). در این مطالعه مشخص شد نانوکپسوله کردن عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* موجب می‌شود، قدرت کنترل قارچ عامل بیماری (*M. phaseolina*) در روزهای ۴ و ۵ توسط نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum*، افزایش یابد. این افزایش به دلیل رهایش کنترل شده ماده موثره در نانوکپسول‌ها می‌باشد. در حالی‌که در عصاره خام این قارچ آنتاگونیست، ماده موثره به یک‌باره در روزهای دوم و سوم، آزاد می‌گردد. از مزیت‌های دیگر فرایند نانوکپسوله کردن، افزایش پایداری عصاره قارچ *T. harzianum* است. بدین‌ترتیب با گذشت زمان، نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ *T. harzianum*، اثر بازدارندگی خود را حفظ می‌نمایند. لوکاتلی و همکاران نیز توانستند با تولید گرانول‌های نانوکپسوله شده گونه‌های مختلف تریکودرما (از جمله *T. harzianum*)، موجب پایداری بیشتر فرمولاسیون‌های تریکودرما و اثربخشی بهتر این قارچ آنتاگونیست شوند (Locatelli *et al.*, 2017). جوریک و همکاران (Juric *et al.*, 2019) با کپسوله نمودن *T. viride*، ضمن محافظت قارچ آنتاگونیست در برابر عوامل مضر محیطی، توانستند میزان رهایش ماده موثره *T. viride* را نیز کنترل نمایند. ماریویاما و همکارانش (Maruyama *et al.*, 2020)، با تولید میکروکپسول‌های حاوی قارچ *T. harzianum* توانستند ماندگاری، اثربخشی، فعالیت کیتینولیتیک و سلولیتیک این قارچ را افزایش دهند. آنها همچنین نشان دادند قارچ کپسوله شده در مقایسه با شاهد، اثر ضدقارچی بیشتری بر قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* دارد.

کاربرد کیتوسان در تولید نانوذرات کپسوله شده موجب می‌شود، کنترل زیستی بهتر و موثرتر صورت گیرد (Thai *et al.*, 2020). اثر حضور همزمان کیتین و کیتوسان بر افزایش قدرت کنترل زیستی گونه‌های تریکودرما، توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. آنها نشان دادند، حضور همزمان کیتین و کیتوسان، مکانیسم‌های کنترل بیولوژیکی تریکودرما را فعال‌تر و اثرگذارتر می‌کند. تنوع آنزیم‌های تولید شده توسط کیتین و کیتوسان، موجب اجرای مکانیسم مایکوپارازیتیسم به بهترین شکل توسط قارچ آنتاگونیست می‌شود. از طرف دیگر کیتوسان، دیواره سلول‌هایی از تریکودرما را که تحت اثر بیمارگرها تخریب شدند، بازسازی می‌نماید (Kappel *et al.*, 2020). پیل و همکاران (Peil *et al.*, 2020)، *T. reesei* را با هدف بهبود کیفیت رهایش آنزیم و اثر آن بر روی بیمارگرهای تنه درخت انگور، کپسوله نمودند. گونه‌های قارچی آنتاگونیست به دلیل ماندگاری پایین و جوانه‌زنی غیرقابل کنترل، توان کنترل مناسب این بیماری را نداشتند. آنها توانستند با کپسوله کردن *T. reesei*، قدرت کنترل زیستی این قارچ آنتاگونیست را به میزان قابل توجهی افزایش دهند.

وهابی و همکاران (Vahabi *et al.*, 2011)، توانستند با استفاده از توده میسلیومی قارچ *T. reesei*، بیوسنتز خارج سلولی نانوذرات نقره با ابعاد ۵۰–۵ نانومتر تولید نمایند. در این روش، قرار گرفتن میسلیوم قارچ در معرض محلول نیترات نقره، موجب تحریک تولید آنزیم‌ها و متابولیت‌های قارچ می‌شود. از آنجا که این قارچ دوستدار محیط زیست می‌تواند متابولیت‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی فراوانی تولید نماید، به نظر می‌رسد این روش می‌تواند در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

در عمده پژوهش‌هایی که ارائه گردید، اسپر یا میسلیوم گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما، نانوکپسوله شدند و تاکنون نانوکپسوله‌کردن عصاره قارچ *T. harzianum* گزارش نشده است. از مزایای نانوکپسوله‌کردن، وابستگی کمتر به افزایش غلظت ماده مؤثره است که عاملی مطلوب و هدفمند در کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی محسوب می‌شود. براساس نتایج تحقیق حاضر، با کپسوله کردن عصاره قارچ تریکودرما در قالب نانوذرات کیتوسان–تری‌پلی‌فسفات، نیاز به غلظت بالای متابولیت‌های ثانویه قارچ آنتاگونیست به شکل قابل توجهی کاهش یافت و اثرات بازدارندگی فرمولاسیون نانو مورد مطالعه با سرعت رهایش تدریجی، مطلوب‌تر ارزیابی گردید. آزمایشات تکمیلی در سایر پاتوسیستم‌ها و نیز ارزیابی فرمولاسیون حاضر در مقیاس بزرگتر جهت اعتبارسنجی به نتایج پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1-Abdelkader, H., Hussain, S., & Abdullah, N. (2018). Review on micro-encapsulation with chitosan for pharmaceuticals applications. *MOJ Current Research & Reviews* *1*(2): 77-84. https://doi.org/10.15406/mojcrr.2018.01.00013.

2- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., & Aminabhavi, T.M. (2004). Recent advances on chitosan based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release 100*(1): 5-28. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010.

3- Akbari, M., Rahimi, Z., & Rahimi, M. (2021). Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in active and passive microchannels. *Research in Pharmaceutical Sciences 16*(1): 79-93. https://doi.org/10.4103/1735-5362.305191.

4- Caputo, F., Clogston, J.B., Calzolai, L.C., Rösslein, M.D. & Prina-Mello, A. (2019). Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of Controlled Release* 299: 31–43. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030.

5- Evidente, A., Cabras, A., Maddau, L., Serra, S., Andolfi, A., & Motta, A. (2003). Viridepyronone, a new antifungal 6-Substituted 2H-Pyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 51*(24): 6957-69. https://doi.org/10.1021/jf034708j60.

Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse. Low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 90: 21-27. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042.

7- Harman, G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology 96*(2): 190-194. https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190.

8- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences 10*(4): 27-33. https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290.

9- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease 87*(1): 4-10.

10- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J.W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology 99*(8): 3395-3405.

11- Jelen, H., Błaszczyk, L., Chełkowski, J., Rogowicz, K., & Strakowska, J. (2013). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress 13*(3): 589-600. https://doi.org/10.1007/s11557-013-0942-2.

12- Juric, S., Đermic, E., Topolovec-Pintaric, S., Bedek, M., & Vinceković, M. (2019). Physicochemical properties and releae characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. *Journal of Integrative Agriculture 18*(11): 2534–2548. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62634-1.

13- Kappel, L., Munsterkotter, M., Sipos, G., Escobar Rodriguez, C., & Gruber, S. (2020). Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. *PLoS Pathogens 16*(2): e1008320. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008320.

14- Kucuk, C., & Kivanc, M. 2005. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turkish Journal of Biology 28*(2-4): 111-115.

15- Kumar, S., Mukherjee, A., & Dutta, J. (2020). Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 196-209. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.002.

16- Locatelli, G.O., dos Santos, G.F., Botelho, P.S., Finkler, C.L.L., & Bueno, L.A. (2017). Development of *Trichoderma* spp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control* http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.

17- Mancera-Lópeza, M.E., Izquierdo-Estéveza, W.F., Escalante-Sáncheza, A., Ibarra, J.E., & Barrera-Cortés, J. (2019). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology 29*(2): 107-130. https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1535053.

18- Maruyama, C.R., Bilesky-José, N., de Lima, R., & Fraceto, L.F. (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8*: 225. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00225.

19- Morath, S.U., Hung, R., & Bennett, J.W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews 26*(2-3): 73-83.

20- Naskar, S., Sharma, S., & Kuotsu, K. (2019). Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology 49*(6): 66-81.

21- Peil, S., Beckers, S.J., Fischer, J., & Wurma, F.R. (2020). Biodegradable, lignin-based encapsulation enables delivery of *Trichoderma reesei* with programmed enzymatic release against grapevine trunk diseases. *Materials Today Biology* 7: 100061. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100061.

22- Reino, J.L., Guerreo, R.F., & Collado I.G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews 7*(1): 89-123.

23- Sarvaiya, J., & Agrawal, Y. (2015). Chitosan as a suitable nanocarrier material for anti- Alzheimer drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 72: 454-465.

24- Sathiyaseelan, A., Saravanakumar, K., Mariadoss, A.V.A., & Wang, M.H. (2020). Biocompatible fungal chitosan

encapsulated phytogenic silver nanoparticles enhanced antidiabetic, antioxidant and antibacterial activity. International *Journal of Biological Macromolecules* 15: 63-71. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.

25- Shahiri Tabarestani, M., Rahnama, K., Jahanshahi, M., Nasrollanejad, S., &Fatemi, M.H. (2016 a). Identification of volatile organic compounds of some *Trichoderma* species using static headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Mycologia Iranica 3*(1): 47-55. https://dx.doi.org/10.22043/mi.2017.41532.1072.

26- Shahiri Tabarestani, M., Rahnama, K., Jahanshahi, M., Nasrollanejad, S., & Fatemi, M.H. (2016 b). Extraction and identification of secondary metabolites produced by *Trichoderma atroviridae* (6022) and evaluating of their antifungal effects. *Journal of Plant Protection 31*(1): 131-141. (In Persian with English abstract). https://dx.doi.org/10.22067/jpp.v31i1.55861.

27- Siddiquee, S., Cheong, B.E., Taslima, K.H., Kausar, H., & Hasan, M.M. (2012). Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of Chromatographic Science 50*(4): 358-367.

28- Siddiquee, S. (2014). Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. p. 139-170. In: Gupta V.K., Schmoll M., Herrera-Estrella A., Upadhyay R. S. and Druzhinina I. (eds.) Biotechnology and biology of *Trichoderma*. Eds. Printed and bound in Poland, Elsevier.

29- Sreekumar, S., Goycoolea, F.M., Moerschbacher, B.M., & Rivera-Rodriguez, G.R. (2018). Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano-and microparticles. *Scientific Reports 8*(1): 1-11.

30-Thai, H., Nguyen, C.H.T., Thach, L.T., & Tran, M.T. (2020). Characterization of chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects in vitro and in vivo. *Scientific Reports 10*(1): 1-15. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57666-8.

31- Vahabi, K.H., Mansoori, G.A., & Karimi, S. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (A route for large-scale production of AgNPs). *Insciences Journal 1*(1): 65-79. https://doi.org/10.5640/insc.010165.

32- Vinale, F., Marra, R., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology 43*(2): 143-148.

33- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L., & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology 72*(1-3): 80-86.

34- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal 24*(2): 127-139.

35- Vincekovic, M., Jalsenjak, N., Topolovec-Pintaric, S., Dermic, E., Bujan, M., & Juric, S. (2016). Encapsulation of biological and chemical agents for plant nutrition and protection: chitosan/alginate microcapsules loaded with copper cations and *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 64*(43): 8073-8083. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02879.

36- Wu, H., Xu, Y., Liu, G., Ling, J., Dash, B.C., Ruan, J., & Zhang, C. (2014). Emulsion cross-linked chitosan/nanohydroxyapatite microspheres for controlled release of alendronate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine 25*(12): 2649-2658. https://doi.org/10.1007/s10856-014-5289-y.

37-Wu, J., Wang, Y., Yang, H., Liu, X., & Lu, Z. (2017). Preparation and biological activity studies of resveratrol loaded ionically cross-linked chitosan-TPP nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 175: 170-177. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.058. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28917853.